

甘南栽培唐古特大黄抗炎作用及机制分析

王志旺, 郭玫*, 马丹, 妥海燕, 王瑞琼
(甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:对比研究甘南栽培唐古特大黄抗炎作用及机制。方法:分别选取 SPF 级 KM 小鼠及 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,通过二甲苯致小鼠耳肿胀法、甲醛致小鼠足肿胀法及角叉菜胶致大鼠足肿胀法来对比考察甘南栽培唐古特大黄高、低剂量(小鼠给药剂量 4.5, 1.5 g·kg⁻¹, 大鼠给药剂量 3.0, 1.0 g·kg⁻¹), 西宁栽培唐古特大黄高、低剂量(小鼠给药剂量 4.5, 1.5 g·kg⁻¹, 大鼠给药剂量 3.0, 1.0 g·kg⁻¹)与礼县栽培掌叶大黄高、低剂量(小鼠给药剂量 4.5, 1.5 g·kg⁻¹, 大鼠给药剂量 3.0, 1.0 g·kg⁻¹)的抗炎作用;复制小鼠气囊滑膜炎,通过测定炎症渗出物中总蛋白及白三烯 B₄(LTB₄)的含量对比考察大黄高、低剂量的抗炎机制,实验中另外设正常组。结果:与正常组比较,1.5, 4.5 g·kg⁻¹甘南栽培唐古特大黄、西宁栽培唐古特大黄与礼县栽培掌叶大黄可明显缓解小鼠耳廓肿胀度与小鼠和大鼠(1.0, 3.0 g·kg⁻¹)足肿胀度($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,1.5, 4.5 g·kg⁻¹甘南栽培唐古特大黄、西宁栽培唐古特大黄与礼县栽培掌叶大黄可明显降低气囊滑膜炎渗出物中总蛋白与 LTB₄的含量,而甘南栽培唐古特大黄、西宁栽培唐古特大黄抑制炎症渗出物中总蛋白与 LTB₄的作用明显优于礼县栽培掌叶大黄($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:3种人工栽培大黄有明显的抗炎作用;唐古特大黄的部分抗炎作用优于掌叶大黄,而甘南栽培唐古特大黄与西宁栽培唐古特大黄的抗炎作用无明显差异;抑制 LTB₄生成是3种大黄抗炎机制之一。

[关键词] 甘南栽培唐古特大黄;耳肿胀;足肿胀;白三烯 B₄;对比研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0158-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016010158

Analysis of Anti-inflammatory Effect and Mechanism of *Rheum tanguticum* Cultivated in South of Gansu

WANG Zhi-wang, GUO Mei*, MA Dan, TUO Hai-yan, WANG Rui-qiong

(Pharmacy Department of Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To conduct a comparative study on anti-inflammatory effect and its mechanism of *Rheum tanguticum* cultivated in Ganan state (RT-GN). **Method:** The SPF KM mice and SPF male Wistar rats were selected, and with the methods of xylene-induced mice ear swelling, formaldehyde-induced mice foot swelling and carrageenan-induced rats foot swelling, they were compared with high and low doses *R. tanguticum* cultivated in south of Gansu (4.5, 1.5 g·kg⁻¹ for mice, and 3.0, 1.0 g·kg⁻¹ for rats), high and low doses *R. tanguticum* cultivated in Xining (4.5, 1.5 g·kg⁻¹ for mice, and 3.0, 1.0 g·kg⁻¹ for rats) and high and low doses *R. palmatum* cultivated in Lixian County (4.5, 1.5 g·kg⁻¹ for mice, and 3.0, 1.0 g·kg⁻¹ for rats) for anti-inflammatory effects. Mice airbag synovitis was replicated, and the determination of total protein and leukotriene B₄ (LTB₄) in the inflammatory exudate was done to comparatively investigate the anti-inflammatory mechanism of high and low dose rhubarb. Normal group was also set in the experiment. **Result:** Compared with the normal group, *R. tanguticum* cultivated in south of Gansu (RT-GN), *R. tanguticum* cultivated in Xining (RT-XN), and *R. palmatum* cultivated in Lixian (RP-LX) could remit degree of auricular swelling in mice and foot swelling in

[收稿日期] 20150228(005)

[基金项目] 甘南州科技开发交流中心基金项目(BH2012-H01)

[第一作者] 王志旺,副教授,硕士,从事药理学研究, Tel:0931-8765395, E-mail:wzw0933@126.com

[通讯作者] *郭玫,教授,硕士生导师,从事中药有效成分与质量标准研究, Tel:0931-8765394, E-mail:guomeig@sina.com

mice and rats ($1.0, 3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the model group, $1.5, 4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ RT-GN, RT-XN, and RP-LX could significantly reduce total protein and LTB_4 in airbag synovitis exudates, and the effects of RT-GN and RT-XN on total protein and LTB_4 in inflammatory exudates were superior to that of RP-LX ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Three kinds of cultivated *Rhubarb* have obvious anti-inflammatory effect, part anti-inflammatory effect of *R. Tanguticum* was superior to that of *R. palmatum*, but there was no significant difference in anti-inflammatory effect between RT-GN and RT-XN, and one of their mechanisms is to inhibit the production of LTB_4 .

[Key words] *Rheum tanguticum* cultivated in Gannan state; auricular swelling; foot swelling; leukotriene B_4 ; comparative study

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* 唐古特大黄 *R. tanguticum* 或药用大黄 *R. officinale* 的根及根茎^[1], 掌叶大黄主产于青海、甘肃、四川等地, 唐古特大黄主产于青海南部、甘肃南部和西藏偏东部地区^[2-3]。现代研究显示, 唐古特大黄的部分药理作用优于掌叶大黄和药用大黄^[4], 而作为优质栽培资源的唐古特大黄日益受到人们的重视, 近年来的需求量、特别是出口的需求量迅速增加。本研究组就大黄的来源及产地对其主要药效学的影响展开对比研究。本次研究对比考察甘南栽培唐古特大黄、西宁栽培唐古特大黄及礼县栽培掌叶大黄的抗炎作用, 为甘南栽培唐古特大黄的临床应用与出口评价提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 KM 小鼠, SPF 级, 18 ~ 22 g, 由甘肃中医学院实验动物中心提供, 实验动物质量合格证号 SCXK(甘)2011-0001; 雄性 Wistar 大鼠, SPF 级, 140 ~ 160 g, 由甘肃中医学院实验动物中心提供, 实验动物质量合格证号 SCXK(甘)2011-0001。SPF 级实验室, 合格证号为 SYXK(甘)2011-0001。

1.2 药物及试剂 甘南栽培唐古特大黄(RT-GN)、西宁栽培唐古特大黄(RT-XN)与礼县栽培掌叶大黄(RP-LX), 人工栽培至第 4 年 10 月份采挖, 经本校杨扶德教授鉴定。白三烯 B_4 (LTB_4), 考马斯亮蓝蛋白试剂盒(上海瑞齐生物科技有限公司, 批号分别为 20140305, 201402501)。

1.3 仪器 HH-S 型恒温水浴锅(金坛市正基仪器有限公司), BS1103 sartorius 型电子天平(北京赛多里斯有限公司), TGL-16G 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 受试药的制备 取甘南栽培唐古特大黄(RT-GN), 西宁栽培唐古特大黄(RT-XN)与礼县栽培掌叶大黄(RP-LX)适量, 用黄酒(每 100 kg 大黄用黄

酒 30 kg) 拌匀, 闷 2 h 至酒被吸尽, 置笼屉内, 隔水蒸 24 h, 取出, 干燥, 粉碎即得熟大黄粗粉。称取熟大黄粗粉适量, 用蒸馏水煎煮两次(分别加水 10 倍与 8 倍量、煎煮 60 min 与 40 min), 过滤, 滤液适当浓缩, 冷藏, 7 d 内使用。

2.2 甘南栽培唐古特大黄对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 取小鼠 84 只, 雌雄各半, 按性别体重分层随机分为 7 组, 即正常组, 甘南栽培唐古特大黄高、低剂量组, 西宁栽培唐古特大黄高、低剂量组, 礼县栽培掌叶大黄高、低剂量组。各组分别灌胃 RT-GN ($4.5, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), RT-XN ($4.5, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), RP-LX ($4.5, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 正常组灌胃蒸馏水 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d, 连续 3 d。末次给药 1 h 后于每鼠右耳两侧均匀涂抹二甲苯 $50 \mu\text{L}$, 致炎 30 min 后处死动物, 用直径 8 mm 的打孔器于小鼠两耳相同部位打下耳片, 称重, 计算小鼠耳肿胀度。

2.3 甘南栽培唐古特大黄对甲醛所致小鼠足肿胀的影响^[5-6] 取小鼠 84 只, 分组、给药同 2.2 项下。末次给药后于每鼠右后足足垫皮下注射 5% 甲醛 $15 \mu\text{L}$, 致炎 4 h 后处死动物, 在小鼠后足同一部位处剪下左右后足, 称重, 计算小鼠足肿胀度。

2.4 甘南栽培唐古特大黄对角叉菜胶所致大鼠足肿胀的影响^[7-8] 取雄性 Wistar 大鼠 56 只, 按体重分层随机分为 7 组, 即正常组, 甘南栽培唐古特大黄高、低剂量组, 西宁栽培唐古特大黄高、低剂量组, 礼县栽培掌叶大黄高、低剂量组。在大鼠右后足踝关节处作标记, 参考足容积测定相关方法, 测定各鼠足容积两次, 取其平均值为大鼠正常右足容积。各组分别灌胃 RT-GN ($3.0, 1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), RT-XN ($3.0, 1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), RP-LX ($3.0, 1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 正常组灌胃蒸馏水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d, 连续 3 d。末次给药 30 min 后, 于右后足跖部皮下注射 1% 角叉菜胶 $0.1 \text{ mL}/\text{只}$, 测定致炎后 30, 90, 180, 360 min 大鼠右后足容积 2 次并计平均值, 计算足肿胀度。

2.5 甘南栽培唐古特大黄对小鼠气囊滑膜炎渗出物中蛋白及 LTB_4 的影响 参考相关实验方法^[9], 将雄性小鼠于实验第 1 天在背部 *sc* 过滤空气 10 mL, 后续实验过程中每天补充注射空气, 使小鼠背部气囊维持在第 1 次注射后的大小。第 3 天将小鼠按体重分层随机分为 8 组, 即正常组, 模型组, 甘南栽培唐古特大黄高、低剂量组, 西宁栽培唐古特大黄高、低剂量组, 礼县栽培掌叶大黄高、低剂量组。各组分别灌胃 RT-GN ($4.5, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), RT-XN ($4.5, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), RP-LX ($4.5, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 正常组与模型组灌胃蒸馏水 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d, 连续 4 d。第 5 天给药后向小鼠背部气囊注射含 1% 甲醛的生理盐水 $0.2 \text{ mL}/\text{只}$, 正常组注射等量生理盐水。致炎 24 h, 小鼠给药 1 h 后, 用 2% 戊巴比妥钠 *ip* 麻醉, 取 Hank's 液 1 mL 灌洗气囊, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心灌洗液 10 min, 取上清液按试剂盒说明书测定渗出液中总蛋白与 LTB_4 的含量。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 $1.5 \sim 4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量范围内的甘南栽培唐古特大黄、西宁栽培唐古特大黄与礼县栽培掌叶大黄可明显降低小鼠耳廓肿胀程度, 与正常组比较有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$); 相同剂量甘南栽培唐古特大黄、西宁栽培唐古特大黄与礼县栽培掌叶大黄的抗炎作用无明显差异。见表 1。

表 1 甘南栽培唐古特大黄对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of *Rheum tanguticum* cultivated in Gannan state on mice's auricular swelling induced by dimethylbenzene ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	耳廓肿胀度 $/\text{mg}$	肿胀抑制率 $/\%$
正常	-	20.50 ± 4.01	-
甘南栽培唐古特大黄	4.5	$13.83 \pm 3.91^{2)}$	32.5
	1.5	$14.89 \pm 3.58^{2)}$	27.4
西宁栽培唐古特大黄	4.5	$13.70 \pm 3.82^{2)}$	33.2
	1.5	$14.95 \pm 3.24^{2)}$	27.1
礼县栽培掌叶大黄	4.5	$15.11 \pm 3.98^{2)}$	26.3
	1.5	$16.78 \pm 4.04^{1)}$	18.1

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与相同来源大黄低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.2 对甲醛所致小鼠足肿胀的影响 甘南栽培唐古特大黄、西宁栽培唐古特大黄与礼县栽培掌叶大黄能降低小鼠足肿胀度, 与正常组比较有统计学意义 ($P < 0.01$); 与相应低剂量组比较, 甘南栽培唐古特大黄高剂量组、西宁栽培唐古特大黄高剂量组的足肿胀度明显减小 ($P < 0.05$), 显示出一定的量效关系。但相同剂量 3 种大黄抑制足肿胀的作用未见明显差异。见表 2。

表 2 甘南栽培唐古特大黄对甲醛所致小鼠足肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of *Rheum tanguticum* cultivated in Gannan state on mice's foot swelling induced by formaldehyde ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	足肿胀度 $/\text{mg}$	肿胀抑制率 $/\%$
正常	-	33.93 ± 5.43	-
甘南栽培唐古特大黄	4.5	$22.87 \pm 3.73^{2,3)}$	32.6
	1.5	$26.54 \pm 4.31^{2)}$	21.8
西宁栽培唐古特大黄	4.5	$22.73 \pm 3.32^{2,3)}$	33.0
	1.5	$26.14 \pm 4.08^{2)}$	22.9
礼县栽培掌叶大黄	4.5	$24.26 \pm 3.52^{2)}$	28.5
	1.5	$27.37 \pm 4.81^{2)}$	19.3

3.3 对角叉菜胶所致大鼠足肿胀的影响 大鼠足趾皮下注射角叉菜胶后出现明显肿胀并随时间的延长 ($30 \sim 360 \text{ min}$) 而加重, 经甘南栽培唐古特大黄、西宁栽培唐古特大黄与礼县栽培掌叶大黄防治后, 足肿胀度显著减小, 与正常组比较有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

3.4 对小鼠气囊滑膜炎渗出物中总蛋白及 LTB_4 的影响 向小鼠气囊注射甲醛致炎 24 h 后, 炎性渗出物中总蛋白与 LTB_4 的含量异常增加, 与正常组比较有统计学意义 ($P < 0.01$); 经大黄干预后, 总蛋白与 LTB_4 的含量显著降低, 与模型组比较有统计学意义 ($P < 0.01$), 且在 $1.5 \sim 4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量范围内有明显的量效关系 ($P < 0.05, P < 0.01$)。同时实验结果显示, 甘南栽培唐古特大黄与西宁栽培唐古特大黄对炎性渗出物中总蛋白及 LTB_4 分泌的抑制作用明显优于等剂量的礼县栽培掌叶大黄 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

4 讨论

影响药物效应的因素非常多, 而影响中药药效的药物因素尤为复杂, 如中药的品种与产地、采收与储藏、炮制与制剂、配伍与煎煮等等, 导致中药药效的不确定而影响中药的临床应用。由于生长环境对

表 3 甘南栽培唐古特大黄对角叉菜胶所致大鼠足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of *Rheum tanguticum* cultivated in Gannan state on rats' foot swelling induced by carrageenan ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	正常足容积 /mL	足肿胀度/mL			
			30 min	90 min	180 min	360 min
正常	-	1.42 ± 0.14	0.26 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.38 ± 0.04
甘南栽培唐古特大黄	3.0	1.40 ± 0.13	0.21 ± 0.03 ²⁾	0.25 ± 0.03 ²⁾	0.29 ± 0.04 ²⁾	0.31 ± 0.04 ²⁾
	1.0	1.41 ± 0.14	0.22 ± 0.03 ¹⁾	0.27 ± 0.04 ²⁾	0.31 ± 0.04 ¹⁾	0.33 ± 0.05 ¹⁾
西宁栽培唐古特大黄	3.0	1.41 ± 0.12	0.20 ± 0.02 ²⁾	0.24 ± 0.04 ²⁾	0.29 ± 0.04 ²⁾	0.30 ± 0.04 ²⁾
	1.0	1.42 ± 0.13	0.21 ± 0.03 ²⁾	0.26 ± 0.04 ²⁾	0.30 ± 0.04 ¹⁾	0.32 ± 0.04 ²⁾
礼县栽培掌叶大黄	3.0	1.41 ± 0.12	0.22 ± 0.03 ¹⁾	0.26 ± 0.04 ²⁾	0.29 ± 0.05 ¹⁾	0.33 ± 0.05 ¹⁾
	1.0	1.41 ± 0.11	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.04 ¹⁾	0.32 ± 0.05	0.35 ± 0.05

表 4 甘南栽培唐古特大黄对小鼠气囊滑膜炎渗出物中总蛋白及 LTB₄ 的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Effect of *Rheum tanguticum* cultivated in Gannan state on total protein and LTB₄ in inflammatory exudates of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	总蛋白 /g·L ⁻¹	LTB ₄ /μg·L ⁻¹
模型	-	10.62 ± 1.92	98.28 ± 15.71
甘南栽培唐古特大黄	4.5	5.31 ± 1.05 ^{2,4,5)}	54.15 ± 9.34 ^{2,4,6)}
	1.5	7.03 ± 1.18 ^{2,6)}	67.61 ± 9.99 ^{2,6)}
西宁栽培唐古特大黄	4.5	5.24 ± 1.08 ^{2,4,5)}	55.01 ± 9.66 ^{2,4,6)}
	1.5	6.96 ± 1.20 ^{2,6)}	66.91 ± 9.83 ^{2,6)}
礼县栽培掌叶大黄	4.5	6.41 ± 1.03 ^{2,4)}	68.46 ± 12.23 ^{2,3)}
	1.5	8.45 ± 1.18 ²⁾	81.06 ± 12.92 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与相同来源大黄低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与相同剂量礼县栽培掌叶大黄组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。

中药材有效成分的积累有明显的影 响,故历史上形成的质量好、产量大的药材称为“道地药材”。为保证我国唐古特大黄药材资源的优势,加快优质大黄产区的基地建设,地处道地产区的甘南州建设了一批唐古特大黄 GAP 种植基地。为了考察甘南州 GAP 种植基地所产唐古特大黄的品质,本研究组就甘南栽培唐古特大黄(RT-GN),西宁栽培唐古特大黄(RT-XN)与甘肃礼县栽培掌叶大黄(RP-LX)的主要药理作用展开对比研究,为甘南栽培唐古特大黄的临床应用与出口评价提供理论依据。

实验结果显示,RT-GN,RT-XN 与 RP-LX 有明显的抗炎作用,可明显缓解小鼠耳肿胀度、小鼠与大鼠足肿胀度。炎症是炎症介质引起的局部红、肿、热、痛并伴有全身反应的综合征,白三烯(leukotrienes, LTS)是花生四烯酸在 5-脂氧合酶催化下生成的常见炎症介质,包括白三烯 B₄(LTB₄),

白三烯 C₄(LTC₄)与白三烯 D₄(LTD₄)等^[10]。研究显示,RT-GN,RT-XN 与 RP-LX 对小鼠气囊滑膜炎性渗出物中总蛋白及 LTB₄ 的含量有显著的降低作用。研究同时发现,RT-GN 与 RT-XN 对炎性渗出物中总蛋白及 LTB₄ 的抑制作用明显优于 RP-LX,这与之前的研究结果^[4]相一致。

综上所述,甘南栽培唐古特大黄有明显的抗炎作用,其作用强度与西宁栽培唐古特大黄无明显差异而略优于礼县栽培掌叶大黄。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:22.
 [2] 焦东海. 大黄研究[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:115.
 [3] 王岩,宋良科,王小宁,等. 大黄种质考证与资源分布[J]. 中国药房,2013,24(11):1040-1043.
 [4] 王家葵,李傲,王慧,等. 正品大黄不同品种间泻下效价强度比较研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):1987-1990.
 [5] 耿东升,王雪飞,陈雪莲. 瘤果黑种草子挥发油抗炎、祛痰药理作用[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(8):605-608.
 [6] 彭红华,黄健,席雯,等. 山豆根颗粒及其饮片抗炎作用及其机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):265-270.
 [7] 高光武,李玲. 黄芩提取物的抗炎作用及其作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2014,30(6):550-553.
 [8] 曹艳花,李靖,吕鹏月,等. 维他昔布的抗炎镇痛作用研究[J]. 中国药理学杂志,2013,48(20):1736-1739.
 [9] 高阳,王志斌,左泽平,等. 大鼠背部气囊滑膜炎模型的探讨[J]. 中药药理与临床,2013,29(2):189-193.
 [10] 李秀娟,王嘉锋,张燕,等. 白三烯 B₄ 受体 1 拮抗剂 U75302 对脓毒症小鼠细胞免疫与炎症反应的影响[J]. 第二军医大学学报,2014,35(3):246-249.

[责任编辑 周冰冰]